

氏 名 まは いっさむ あぶどるかでる なぎぶ わり
Maha Essam Abdelkader Naguib Wally

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 記 番 号 富生命博甲第 135 号

学位授与年月日 令和 3 年 9 月 28 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院生命融合科学教育部 博士課程
認知・情動脳科学 専攻

学位論文題目
Uncovering long-term existence of a short-term memory using optogenetics,
pharmacology and *in vivo* calcium imaging
(光遺伝学的手法・薬理学的手法・カルシウムイメージング法による
短期記憶の長期的存在の解明)

論文審査委員

(主査) 教 授 森 寿

(副査) 教 授 田村 了以

(副査) 教 授 中辻 裕司


(副査) 准教授 高橋 努

(指導教員) 教 授 井ノ口 馨

Abstract

Active recall of short-term memory (STM) formed by exposure to weak events is known to last for few hours, however, whether and how there is a possibility that traces of STM continue to exist beyond a few hours, and if so, whether these traces provide long-term functions remain unclear. This study shows that, an STM formed by exposing mice to a weak event can be optogenetically retrieved one day later, a time point during which natural recall is not possible, uncovering the long-term existence of the STM in the form of a silent engram. Re-exposure to the same weak event within three days resulted in natural long-term recall of the STM, unveiling the possibility of utilizing the silent STM engram as a template in facilitating future consolidation. Pharmacological inhibition of the hippocampal protein synthesis using anisomycin drug or pharmacological blockade of the hippocampal N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) using D-AP5 drug after the first exposure to the STM-forming event impaired this re-exposure facilitated consolidation, highlighting the molecular mechanisms of the STM engram storage. *In vivo* calcium imaging from hippocampal CA1 revealed reactivations of the STM neuronal trace during post-learning non-rapid eye movement (NREM) sleep, which further demonstrates the cellular mechanisms of the STM engram storage. Sleep deprivation or optogenetic silencing of the hippocampal CA1 neurons during post-learning NREM sleep disrupted the availability of the silent STM engram for future use, providing a causal link between offline hippocampal CA1 neuronal activity and the silent STM engram storage. These results demonstrate that the STM is not entirely erased from the brain but continues to exist in a silent manner through post-learning protein synthesis, NMDAR-activation and NREM sleep reactivations. Furthermore, these results provide evidence of a two-step STM consolidation; first storage of the STM as a silent trace and then transformation into an active trace by recurrence within three days.

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

報 告 番 号	富生命博甲第 号 富生命博乙第 号	氏 名	Maha Essam Abdelkader Naguib Wally
論文審査委員	職 名 (主査) 教 授 (副査) 教 授 (副査) 准教授 (副査) 教 授	氏 名 森 寿 田村 了以 高橋 努 中辻 裕司	
指導（紹介）教員	教 授	井ノ口 馨	
(論文題目 英文の場合は和訳，日本文の場合は英訳を付記すること) Uncovering long-term existence of a short-term memory using optogenetics, pharmacology and <i>in vivo</i> calcium imaging (光遺伝学的方法、薬理学的方法、脳内カルシウムイメージング法を用いた短期記憶の長期的存在の解明)			(判定) 合 格
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>研究目的：</p> <p>記憶は、獲得、強化、想起の過程から構成され、数時間保持される短期記憶から、年単位で保持される長期記憶まで、様々のタイプがある。記憶の過程に関わる記憶痕跡（エンGRAM）神経細胞集団は、記憶獲得時に活性化され、集団としての活動状態を保持し、再活性化により記憶の想起に関わっている。エンGRAMには、生理的な記憶想起に関わる活性(active)型と、人工的な活性化で想起を引き起こせる静止(silent)型が存在する。これまでのエンGRAM研究は、主に長期記憶での役割や機構が研究されてきたが、短期記憶のエンGRAMについては、ほとんど明らかにされていない。そこで、Wallyさんは、「短期記憶のエンGRAMは静止型で長期間存在する」との検証仮説のもと、マウスを用いて新規物体位置記憶課題を確立し、短期記憶のエンGRAM細胞の存在とその性質および睡眠の関与について、光遺伝学的操作法、薬理学的操作法、脳内カルシウムイメージング法を用いて検討することを目的に、本研究を行なった。</p> <p>研究方法と結果：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 短期記憶課題の確立とその性質の解析：マウスに箱空間内で2つの同じ物体の位置を探索させる訓練を行い、一定時間後に2つの物体のうち片方の位置を変え、位置を記憶しているかテストを行なう新規物体位置記憶課題を確立した。マウスが2つの物体の位置を記憶していれば、位置を変更した物体を探索する時間が有意に上昇する。この課題記憶は、訓練時間が15分間では24時間後も記憶している長期記憶となるが、訓練時間が6分間では30分後は記憶しているが、24時間後には記憶していない短期記憶であった。 2) 短期記憶エンGRAMの光遺伝学的活性化：確立した短期記憶課題は、海馬CA1領域依存的事から、遺伝学的手法を用いて訓練時に形成されたCA1エンGRAM細胞で特異的に光活性化型チャネルロドプシン (ChR2)を発現させ、記憶想起ができなかった訓練24時間後に光照射すると、記憶を想起することができた。このことから短期記憶のエンGRAMは、静止型で訓練後24時間は継続して存在すると考えられた。 3) 静止型短期記憶エンGRAMの継続期間：6分間の訓練後、再訓練を1日後および 3日後に行うと、短期記憶は24時間保持される長期記憶となったが、6日後の再訓練では記憶想起ができ 			

なかった。したがって、静止型の短期記憶エンGRAMは、3日間は継続して存在すると考えられた。

- 4) 静止型短期記憶エンGRAMの保持と活性化の分子機構：短期記憶訓練直後に、CA1領域にタンパク質合成阻害薬(アノマイシン)、あるいはNMDA型グルタミン酸受容体 (NMDAR) のアンタゴニスト (APV) を投与すると、24時間後に短期記憶の再訓練を行なっても長期記憶は形成されなかった。また、2回目の訓練後にAPVを同様に投与しても長期記憶は形成されなかった。したがって、静止型短期記憶エンGRAMの保持はタンパク質合成とNMDAR依存的な分子機構に依存していると考えられた。
- 5) 静止型短期記憶エンGRAMの保持と活性化の細胞機構：遺伝学的Ca²⁺指示タンパク質 (G-CaMP7) をCA1領域の興奮性錐体細胞に発現させ、超小型内視蛍光顕微鏡を用いた細胞内Ca²⁺動態の可視化解析を行なった。その結果、短期記憶の訓練時に細胞内Ca²⁺活動の上昇が観察された細胞群が存在し、それらの細胞では、訓練後のノンレム睡眠時、24時間後の再訓練時、再訓練後のノンレム睡眠時、さらにテスト時にCa²⁺活動の上昇が継続して観察された。
- 6) 静止型短期記憶エンGRAMの保持における睡眠の役割の解析：短期記憶訓練直後より5時間の断眠を行うと、1日後に再訓練を行なっても長期記憶は形成されなかった。したがって、静止型短期記憶エンGRAMの保持には睡眠が必要であると考えられた。さらに、CA1領域の興奮性錐体細胞に抑制型チャンネルロドプシン (ArchT) を発現させ、脳波と筋電図を用いて、覚醒期、ノンレム睡眠期、レム睡眠期を区別し、ノンレム睡眠期のみ光刺激で神経活動を抑制することで、短期記憶エンGRAMは保持されないことが明らかとなった。

総括：

本研究で Wally さんは、これまで解析がほとんど行われていなかった短期記憶のエンGRAMについて、マウスを用い新規物体位置記憶課題を新たに確立し、光遺伝学的操作法、薬理学的操作法、脳内カルシウムイメージング法を駆使して短期記憶エンGRAM細胞の存在とその性質および睡眠の関与について明らかにした。Wallyさんの研究により、短期記憶エンGRAMは、海馬CA1領域で、静止 (silent) 型として少なくとも3日間の長期に渡って継続して存在し、再活性化により強化され長期記憶となることが明らかとなった。また、短期記憶エンGRAMの持続には、新規タンパク質合成とNMDA受容体の活性化が分子機構として必要であること、さらノンレム睡眠が必要であることが示された。これらの研究成果は、短期記憶エンGRAMの存在とその性質、その維持の分子機構、睡眠との因果関係などを初めて明らかにした点で、新規性は非常に高い。

また今回の研究成果とこれまでのエンGRAM研究の結果をもとに、短期記憶が静止 (silent) 型のエンGRAMとして保持され、保持されている間に再活性化されることで、活性 (active) 型のエンGRAMに変換され、さらに閾値を越えることで長期記憶へ移行するとの仮説を提唱した点で、医学研究における学術的重要性も非常に高い。

本研究は、ヒトにおける日々の出来事の短期記憶が、同様な出来事に繰り返して遭遇することにより、将来の長期記憶形成の鋳型として機能している可能性を示した点や、ヒトの記憶能力の制御と睡眠の重要性について示唆した点で、今後の臨床的な発展性を期待させる。

研究は綿密な計画のもと、最先端の研究手法を用いて実施され、対照実験も的確に設定され、発表も十分に準備されており分かりやすく、また質疑にも十分に回答していた。

以上より本審査会は本論文を博士 (医学) の学位に十分値すると判断した。